

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

リボウイルス創薬: ウイルスに学ぶ RNA 分子の可能性とその応用

### 2. 氏名

朝長 啓造

### 3. 研究のねらい

近年、機能性 RNA 分子を利用した研究と医薬品の開発が世界各国で精力的に進められている。特に、非コード小分子 RNA である short interfering RNA や short hairpin RNA を利用したターゲット遺伝子の発現抑制と microRNA を用いた翻訳制御は、がんや難治性疾患の治療ならびに感染症への応用が期待されている。機能性 RNA 分子の研究は、生命科学の発展に寄与するのみならず、創薬や再生医療へと応用可能な RNA テクノロジーを生み出すと考えられる。一方で、RNA 分子を創薬として実用化するためには、いまだ解決すべき問題が残されている。それは、壊れやすい RNA 分子を細胞内で長期間安定に発現させる技術開発に加えて、RNA を生体内の適所に安全に運ぶための効率的なデリバリーシステムの構築と考えられる。

本研究のねらいは、特異な性状を持つ RNA ウイルスの感染動態を利用することにより、機能性 RNA 分子を効率かつ持続的に発現でき、生体への適用にも優れた新規 RNA ウイルスベクターを開発することにある。私たちが研究対象としているボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) は、マイナス鎖一本鎖の RNA をゲノムに持つ神経細胞親和性のウイルスである。BDV は細胞核で持続感染するという他のウイルスでは見られない特徴を持っている。本研究では、細胞核における BDV の複製と持続感染のメカニズムを分子レベルで解明することで、細胞内で RNA を長期に安定化させる技術基盤の構築を目指した。また、独自に開発した組換え BDV 作製技術を応用することで、これまでにない独創的な RNA ウイルスベクターの開発に挑戦した。本研究の最終目標は、BDV の特性を利用したリボウイルス創薬の確立にある。

### 4. 研究成果

#### 1) ボルナ病ウイルスの持続感染機構に関する研究成果

数多く存在する動物由来 RNA ウイルスの中で、細胞核を複製の場として利用するウイルスはボルナウイルス科とオルソミクソウイルス科の 2 科だけである。しかしながら、この 2 科の RNA ウイルスの間には、感染様式に違いがある。オルソミクソウイルス科に属するウイルスが感染細胞への強い細胞傷害性と細胞死の誘導を特徴としているのに対し、ボルナウイルス科に属する BDV は非細胞傷害性の増殖と持続感染を性状としている。この独特な感染様式から、BDV は細胞核に寄生できる唯一の RNA ウイルスであると考えられている。私たちは、動的な環境にある細胞核において BDV がゲノム RNA を安定に維持するメカニズムについて解析を行った。

はじめに、細胞核におけるウイルスゲノム RNA の動態を明らかにするために、ゲノム RNA を含むウイルスのリボヌクレオ蛋白質複合体 (RNP) の核内局在について解析した。BDV 持続感染細胞には、核内に BDV 主要抗原のドット状構造物 (viral speckle of transcripts: vSPOT) が観察された (図 1a、矢印)。vSPOT は、ゲノムならびにアンチゲノム RNA を含み、複製の場あるいはゲノム RNA の成熟の中心であると考えられた。共焦点レーザー顕微鏡ならびにクロマチン結合解析法を用いた観察により、vSPOT はクロマチンに接合して形成されることが明らかとなった。また、核膜が消失した分裂期の細胞では、RNP が濃縮したクロマチンに接合している様子が観察された。興味深いことに、分裂後期では RNP が娘染色体とともにそれぞれの細胞核へと運ばれることが示された (図 1b)。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、BDV RNP はヌクレオプロテイン (N) 蛋白質とコアヒストンとの結合を介してクロマチンに接合していると考えられた。また、染色体上の RNP は複製能力を持つことも確かめられた。

次に、クロマチン上での RNP の複製制御機構について、BDV のリン酸化 (P) 蛋白質と結合する

クロマチン結合性 DNA 構造変換因子、HMGB1 (High-mobility group box protein 1)、に着目して解析を行った。HMGB1 は核内に豊富に存在する蛋白質であり、DNA の構造変換を介して転写を促進する働きを持っている。shRNA を用いて HMGB1 をノックダウンした結果、ノックダウン細胞ではクロマチンに局在する P 蛋白質が減少し、ウイルス mRNA の発現レベルが顕著に低下することが判明した。また、クロマチン上における RNP の安定性も低下することが明らかとなった。さらに、生細胞を用いた観察から、HMGB1 は vSPOT への出入りを頻繁に繰り返していることも確かめられ、BDV はクロマチン上での複製に HMGB1 との相互作用を利用していることが示唆された。

以上の解析により、BDV は細胞周期を通じてクロマチンに局在することで、安定したゲノム RNA の保持と複製制御を成し遂げていると考えられた(図 1c)。本研究により、細胞内における一本鎖 RNA の安定化に関して有用な知見が得られた。

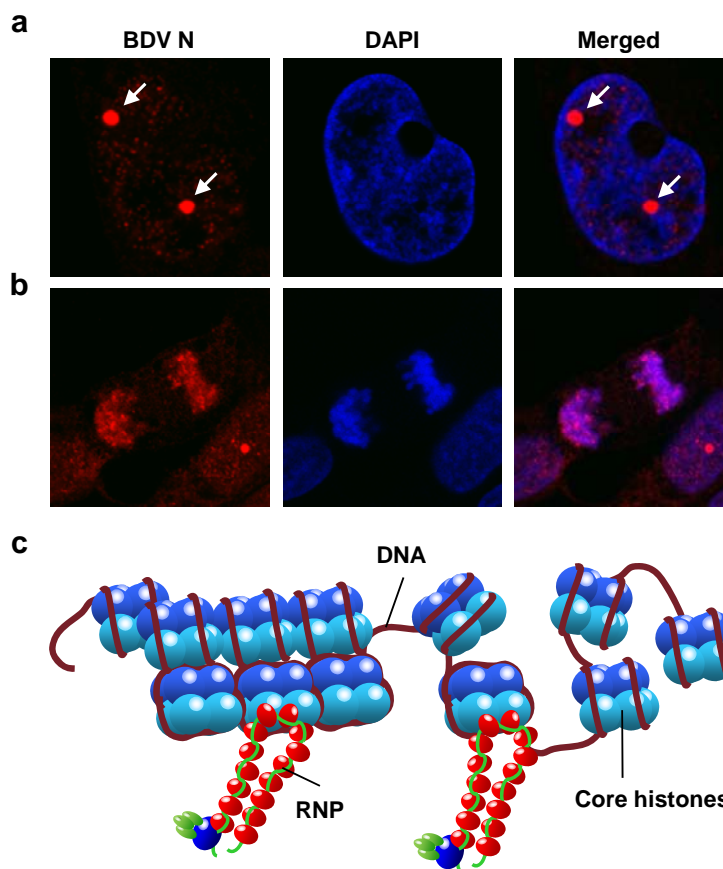


図1. クロマチンを利用したボルナ病ウイルスの核内安定化機構. (a) BDV持続感染細胞核に見られるドット状構造物(vSPOT; 矢印). 間期の細胞核. BDV RNPは抗BDV N抗体(赤)で、クロマチンはDAPI(青)で染色を行った. (b) 分裂後期のBDV持続感染細胞像. BDV RNPは染色体とともに娘細胞の核へと運ばれる. (c) BDV RNPは細胞周期を通じて、コアヒストンを介してクロマチンに接合できる.

## 2) ボルナウイルス N mRNA の逆転写と宿主染色体へのインテグレーションに関する研究成果

私たちの研究成果により、BDV の生活環はクロマチンに高い依存性を示すことが明らかとなった。一方、BDV をウイルスベクターとして利用するためには、BDV 複製が宿主染色体に与える影響についてより詳細に理解する必要があると考えられる。そこで、感染細胞における BDV ゲノムの存在様式について検討を行った。BDV が持続感染した様々な哺乳類細胞より DNA を抽出して、DNase あるいは RNase 処理を行ったのちに BDV 特異的プライマーを用いて PCR を行った。その結果、ヒト由来 OL 細胞、293T 細胞ならびにイヌ由来 MDCK 細胞において、DNase 感受性の BDV DNA が検出された(図 2a)。一方、サル由来 Vero 細胞ならびにラット由来 C6 細胞では確認されなかった。また、BDV が感染したマウス脳においては、感染後約 30 日目より BDV DNA が産生されることが判明した。詳細な解析の結果、検出された DNA は BDV mRNA を鋳型に作り出されていることが明らかとなった(図 2b)。

次に、検出された BDV DNA が染色体外に存在するものなのか、あるいは宿主ゲノムにインテ

グレーションされたものかを明らかにするために、Alu-PCR法を用いた解析を行った。BDV 持続感染細胞から抽出した高分子 DNA を Alu 配列と BDV に特異的なプライマーで増幅を行った。その結果、感染後約 30 日目より特異的バンドが検出され、BDV DNA が宿主ゲノムにインテグレーションされている可能性が示された。さらに、novel Alu-PCR 法と inverse PCR 法を用いて、染色体上における BDV DNA の構造を解析した結果、インテグレーションされた BDV DNA は、その 3' 末端に poly A 様配列を有しており、多くの配列で 5' 側が欠損していることが判明した。また、一部の配列ではその両末端に特異的な繰り返し配列があることが確認された。これらの観察結果により、核内で転写された BDV mRNA は、宿主のレトロトランスポゾン (LINE1 など) の作用により、宿主ゲノムにインテグレーションされることが示唆された (図 2c)。

一方、すべての真核生物のゲノムデータベースを解析した結果、ヒトをはじめとする多くの哺乳類において、BDV の N 遺伝子と相同性の高い配列が存在することが明らかとなった。このことは、ボルナウイルス RNA の逆転写と宿主ゲノムへのインテグレーションが過去の感染で実際に起こったことを示している。これらの結果は、ボルナウイルスの持続感染が宿主ゲノムに遺伝的な新奇性をもたらす可能性を示しており、BDV の新たな病原性機構の存在が示唆された。

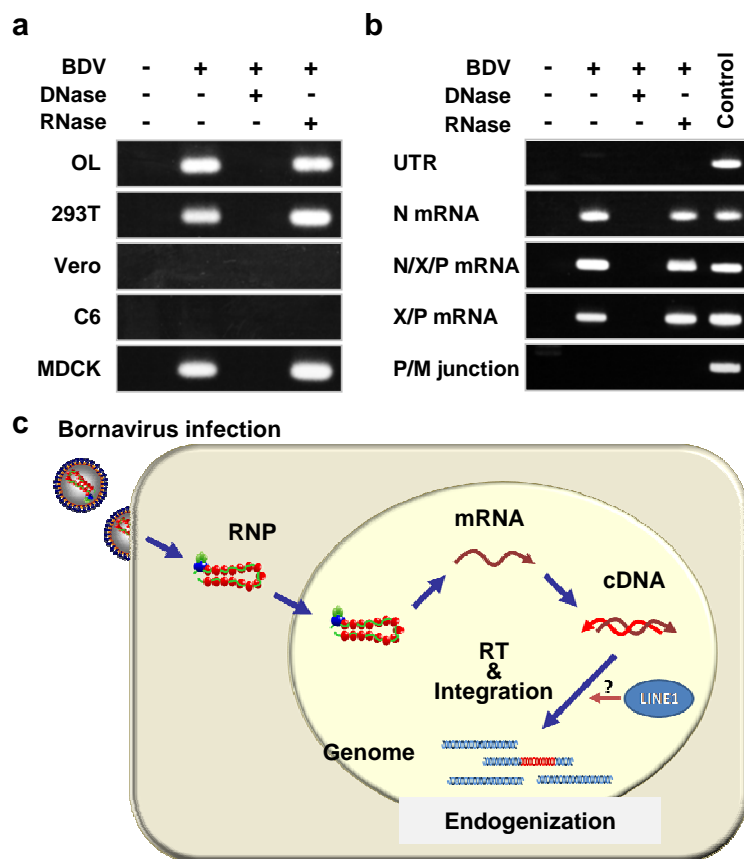


図2. ボルナ病ウイルスの新規病原性機構. (a) 哺乳類由来細胞における BDV DNA の産生. DNase に感受性 DNA が OL, 293T ならびに MDCK 細胞で観察された. (b) BDV 由来 DNA は mRNA の産生と相関して検出された. (c) ボルナウイルスの mRNA は細胞核内で、レトロトランスポゾン (LINE1) の作用により宿主ゲノムにインテグレーションされると考えられた.

### 3) ボルナ病ウイルスを利用した新規ウイルスベクターの開発に関する研究成果

私たちは、BDV のゲノム RNA を発現するプラスミドと N、P、L 蛋白質を発現するプラスミドの計 4 種類を 293T 細胞に導入することで組換え BDV を産生させるリバーシジェネティクス技術を独自に確立している。そこで、この技術を応用することで BDV のゲノム内に外来遺伝子をコードする BDV ベクターの開発を試みた。

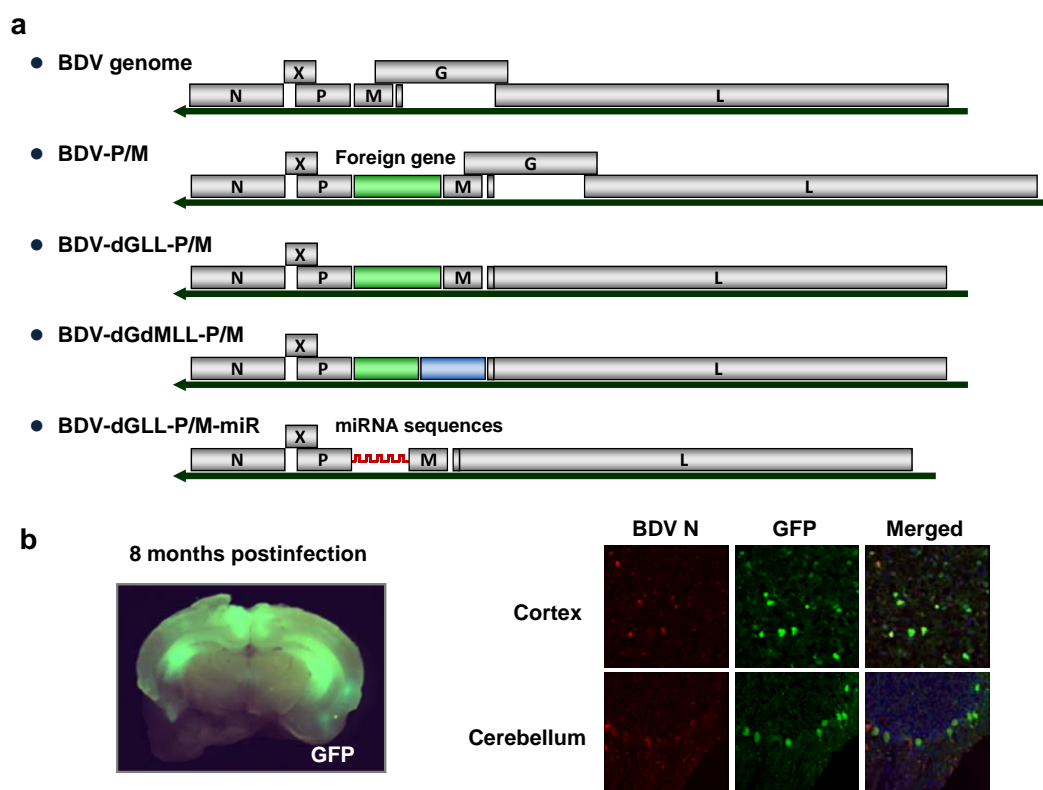
はじめに、BDV ゲノム内における外来遺伝子の挿入部位について検討を行った。GFP 遺伝子をゲノム上のさまざまな領域に挿入して、その発現効率を解析した結果、P 遺伝子と M 遺伝子の間の非コード領域 (P/M) への挿入において、外来遺伝子が効率的に発現されることが明らかとな

り、組換えウイルスの産生も可能であることが示された(図 3a)。P/M 間に GFP 遺伝子を挿入した BDV ベクターから産生された組換え BDV(BDV-P/M GFP)は、ゲノムの 5' 末端に GFP 遺伝子を持つウイルス(BDV-5' GFP)よりも、GFP の発現効率が高く、長期にわたり安定に GFP を発現することが示された。また、P/M 間領域は、5'末端と比較してより大きな外来遺伝子の挿入が可能であることも明らかとなった。さらに、BDV P/M ベクターの外来遺伝子発現の持続性を確認するために、BDV-P/M GFP をマウスおよびラットの脳へ接種を行った。その結果、少なくとも 8 ヶ月間は GFP の発現が海馬あるいは大脳皮質領域の神経細胞で観察され、外来遺伝子の持続的発現が可能なベクターであることが示された(図 3b)。

次に、より効率的で安全性の面でも優れたウイルスベクターの確立を目標に BDV P/M ベクターの改良を行った。主な改良点は、以下の 3 点である。① 病原性と伝播能力を欠損させるために、エンベロープ(E)蛋白質をコードする G ORF の開始コドンに変異を導入した。② 複製効率を上昇させるために、ポリメラーゼ(L)遺伝子内に存在するイントロン配列を欠損させた。③ 外来遺伝子の挿入能力を上げるために、M 遺伝子を欠損させた。①および②の変異を持つ組換え BDV (BDV-dGLL-P/M)(図 3a)は、G 遺伝子を恒常的に発現する Vero 細胞を用いることで回収が可能であった。一方、上記のすべての変異を持つ組換えウイルス(BDV-dGdMLL-P/M)(図 3a)は、G と M 遺伝子を恒常的に発現する細胞を用いて回収した。面白いことに、BDV-dGLL-P/M は、培養細胞内での伝播能力を欠いていたが、持続感染を維持する能力は保持しており、外来遺伝子を長期間、安定に発現できることが示された。BDV-dGdMLL-P/M も培養細胞において持続的な感染が確認されている。以上の結果より、BDV を利用して安全性が高く、効率的で持続性の発現が可能な新規 RNA ウイルスベクターの基本技術の確立に成功した。

確立した BDV ベクターの応用についても検討を行っている。これまでに、P/M 間にアミロイド  $\beta$  ペプチドを分解する中性エンドペプチターゼであるネプリライシン(NEP)遺伝子を挿入したベクターを作成した。NEP をコードしている組換え BDV からは機能性 NEP が発現することが確認された。現在、アミロイド  $\beta$  ペプチドを蓄積するトランスジェニックマウスを用いて、NEP 発現 BDV ベクターの有用性について検討を行っている。

また、本研究の最終目標であった機能性 RNA 分子を持続的に発現するベクター開発も試みた。P/M 間領域に microRNA (miRNA)を産生する配列を挿入することで、RNA ウイルスとしては初めての機能性 RNA 発現ベクターの作製を試みた(BDV-dGLL-P/M-miR)(図 3a)。具体的には、miRNA-155 (miR155)をコードしているゲノム領域をマウスゲノムよりクローニングし、BDV ベクターの P/M 間領域に挿入した。リバーシジェネティクス技術により、そのアンチゲノム鎖に miR155 配列を持つ組換え BDV(BDV-P/M miR155)を作成し、Vero 細胞への感染を行った。その結果、感染細胞において成熟 miR155 の発現が確認され、ターゲット配列を持つ遺伝子の翻訳を有意に抑えることが明らかとなった。また、他の遺伝子に対する miRNA 配列の導入も成功しており、miRNA を発現する組換え BDV が感染したマウス脳内では、ターゲット遺伝子の発現が低下していることも示されている。



**図3. ポルナ病ウイルスを利用した新規ウイルスベクターの開発.** (a) BDVベクターの遺伝子構造. BDVゲノムのP遺伝子とM遺伝子の間に外来遺伝子を挿入した(BDV-P/M). G遺伝子を欠損させるとともに、L遺伝子内のイントロンを削った(BDV-dGLL-GFP). M遺伝子も削ることで外来遺伝子の挿入効率を上昇させた(BDV-dGdMLL-GFP). P-M間にmiRNAを発現できる配列を挿入することでmiRNAを発現できるベクターを構築した(BDV-dGLL-P/M-miR). (b) GFP発現組換えBDV P/Mウイルスを感染させたマウス脳. GFPの発現は少なくとも接種後8ヶ月間は脳内で観察されている.

## 5. 自己評価

本研究の最終目標は、BDVを利用して機能性RNA分子を発現できる新規RNAウイルスベクターを開発することであった。上記4-3)で示したように、これまでにBDVベクターの基本技術の開発は成功し、実験的なレベルではあるがmiRNAを発現するベクターの作製にも成功している。これらの新規の技術に関しては、既に特許出願済みであり、研究成果の②でも示したように、今後のさらなる改良と応用は間違いなく期待できる。BDVを用いたウイルスベクターの開発という観点からは、本研究の目標は達成され、高く評価できると考える。

一方、RNAを細胞内で安定化する技術構築に関しては、クロマチン動態を利用したBDVの持続感染機構の証明で終わっている。現在、BDV RNAがRNPとして核内で安定化する機構を他のRNA分子にも応用できるかを試みている最中であり、今後の課題となっている。また、特許との関連もあるが、研究期間内で発表できなかった論文があるのも反省点の一つである。現在、精力的に執筆中であり、1年以内には数報を発表したいと考えている。

## 6. 研究総括の見解

ポルナ病ウイルス(BDV)は、神経親和性を持ち、細胞核で持続感染する。この特性を生かし、独創的なRNAウイルスベクターの開発を目標とした。まず、ウイルスのRNPがクロマチンに結合していること、核膜のなくなる分裂期の細胞では、濃縮したクロマチンに接合しており、分裂後期で

は RNP が娘染色体とともにそれぞれの細胞核へと運ばれることを示し、感染細胞のなかで BDV ゲノムが安定に維持されるメカニズムが存在することを示した。BDV ベクターの開発は順調に行われ、GFP の発現がマウスおよびラットの海馬や大脳皮質領域の神経細胞で少なくとも 8 ヶ月は安定に続くことを示した。また、miRNA を発現するベクターの作製にも成功した。現在、アミロイドを分解するネプリライシン遺伝子を挿入したベクターを作製し、有用性についての検討を行っており、最終目標をクリアしたことは高く評価できる。さらに、本研究遂行の過程で、BDV の N 遺伝子が宿主ゲノムにインテグレートされることを見出したことは、驚くべきことであった。宿主ゲノムの進化のメカニズムや BDV の新たな病原性発現機構に新知見をもたらしたことを非常に高く評価したい。

## 7. 主な論文等

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### ①論文

1. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM and Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. **Nature** 463:84–87 (2010)
2. Watanabe Y, Ohtaki N, Hayashi Y, Ikuta K and Tomonaga K. Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases. **PLoS Pathog.** 5:e1000654 (2009)
3. Honda T, Horie M, Daito T, Ikuta K and Tomonaga K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at cell surface. **J. Virol.** 83:12622–12625 (2009)

#### ②特許

研究期間累積件数:3 件

発明者:朝長 啓造

発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用

出願人:国立大学法人大阪大学

出願日:平成 20 年 7 月 24 日

出願番号:特願 2008-191285

発明者:朝長 啓造、大東 卓史

発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用

出願人:国立大学法人大阪大学

出願日:平成 21 年 3 月 31 日

出願番号:特願 2009-87608

発明者:朝長啓造、大東卓史、本田知之

発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用

出願人:国立大学法人大阪大学

出願日:平成 22 年 3 月 17 日

出願番号:PCT/JP/2016/054600

#### ③著書

1. 朝長 啓造. 細胞核とRNAウイルス:ボルナウイルスの核輸送と持続感染のメカニズム. 「ウイルス研究の現在と展望」蛋白質 核酸 酵素 増刊号. 52: 1168–1174 (2007)
2. 渡邊 洋平, 朝長 啓造. ボルナウイルス感染症. 人獣共通感染症. p106–113. (2007)
3. 朝長 啓造. ボルナウイルスの核輸送とゲノム動態. 「感染症のサイエンス」実験医学 増刊号. 27:1514–1521. (2009)



4. 朝長 啓造. ボルナウイルス. *臨床と微生物*. 36:233-238. (2009)

(シンポジウム・招待講演)

1. Tomonaga K.: A novel discovery toward understanding the interaction between bornaviruses and mammalian hosts. BDV workshop 2009, [University of Freiburg](#), Freiburg, Germany (2009)
2. Tomonaga K. Bornavirus infection: discovery of a novel interaction between RNA virus and the nucleus. The 3<sup>rd</sup> International CVRDC-RIMD Joint Symposium, Gwangju, Korea (2009)
3. 朝長 啓造: 細胞核におけるボルナウイルスの持続感染 -RNAウイルスの未知なる動態-. 第6回湯河原ウイルス学キャンプ. 湯河原 (2009)
4. 朝長啓造, 堀江真行, 本田知之, 鈴木善幸, 小林由紀, 押田龍夫, 大東卓史, 林 陽平, 生田和良, 五條堀 孝: 内在性ボルナウイルスエレメントとRNAウイルスの内在化プロセス. ワークショップ「レトロエレメントのダイナミズム」 第147回日本獣医学会学術集会 栃木(2009)
5. Tomonaga K, Matsunaga H, and Ikuta K. Bornavirus infection: mechanisms of virus-induced neurological disorders and possible link to chronic fatigue syndrome. International Symposium on Viruses in CFS & Post-viral Fatigue. Baltimore USA (2008)
6. 朝長 啓造: 静かに広がる慢性ウイルス感染症: ボルナ病ウイルスの病原性とその不思議なウイルス性状. 第 2 回人獣共通感染症セミナー. 宮崎大学, 宮崎 (2008)
7. 朝長 啓造: ウイルス感染による高次脳機能障害とグリア細胞. 21世紀COEプログラム「脳の機能統合とその失調」大学院特別プログラム「グリア研究の最前線」東京医科歯科大学 東京 (2007)

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### ①論文

1. Hayashi Y, Horie M, Daito T, Honda T, Ikuta K and Tomonaga K. Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X. **Microbes Infect.** 11:3940-3402 (2009)
2. Lee B-J, Matsunaga H, Ikuta K and Tomonaga K. Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. **Antiviral Res.** 80:380-384 (2008)